

Caracterização morfológica da região intercaruncular uterina de vacas e búfalas gestantes

Rodrigo da Silva Marques¹
Mirella Vulcano¹
Susana M. M. Cazerta¹
Maria Angélica Miglino²
Antônio Chaves de Assis Neto¹
Flávia Thomaz Verechia Pereira^{1*}

¹Faculdade de Zootecnia do Campus Dracena-UNESP
Rod. Com. João Ribeiro de Barros (SP 294) km 651, CEP 17900-000, Dracena – SP, Brasil
²Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP
São Paulo – SP, Brasil

*Autora para correspondência
fverechia@dracena.unesp.br

Submetido em 26/01/2007
Aceito para publicação em 01/06/2007

Resumo

As regiões glandulares denominadas intercarunculares foram encontradas entre as carúnculas uterinas no útero gestante de ruminantes. As glândulas endometriais desempenham importante função de transferência de substâncias da mãe para o feto, incluindo o ferro. Sendo assim, tivemos por objetivo caracterizar estas regiões intercarunculares do útero gestante de vacas zebuínas e búfalas. Amostras destas mesmas regiões de vacas zebuínas (n=57) e búfalas (n=30), em vários estágios de gestação, foram fixadas em solução aquosa de formaldeído a 10% e paraformaldeído a 4% em PBS, processadas e coradas para microscopia de luz, para caracterizar a morfologia e histoquímica (reações de Perl's, PAS e fosfatase ácida), para confirmar a transferência de ferro. A região intercaruncular situou-se entre as carúnculas uterinas e foi composta pelo endométrio, miométrio e perimétrio altamente vascularizado. As glândulas endometriais eram constituídas por epitélio prismático simples e reagiram positivamente ao ferro férrico (reação de Perl's), à enzima fosfatase ácida e à reação do PAS. Analisados conjuntamente, os presentes resultados sustentam a hipótese de que as glândulas endometriais são sítios importantes de secreção e transferência de substâncias da mãe, implicadas na nutrição histiotrófica dos fetos de ruminantes, principalmente as proteínas que agem como enzimas, carreadores de moléculas para hormônios, vitaminas e minerais e como moléculas sinalizadoras do reconhecimento da gestação.

Unitermos: região intercaruncular, gestação, vacas, búfalas, nutrição histiotrófica

Abstract

Morphological characterization of the intercaruncular region of pregnant cows and water buffalo cows. Intercaruncular glandular regions were found among the uterine caruncles in ruminant pregnant uteruses. The endometrial glands play an important role in the substance transfer from dam to fetus, including that of iron. Therefore, our objective was to characterize these intercaruncular regions of the pregnant uterus of zebu and buffalo cows. Small portions of the same regions of zebu (n=57) and water buffalo cows (n=30) were fixed in 10%

formaldehyde and 4% paraformoldehyde in PBS, processed and stained for light microscopy in order to characterize the morphology, and histochemistry (Perl's, PAS and acid phosphatase reactions) to confirm iron transfer. The intercaruncular region was located among the uterine caruncles and was composed by an endometrium, a myometrium, and a richly vascularized perimetrium. The endometrial glands were made up of a simple columnar epithelium and they were reactive to ferric iron (Perl's reaction), acid phosphatase and PAS. Collectively, the present results support the hypothesis that endometrial glands are important sites of secretion and substance transfer from the dam and that they are implicated in the nourishment of the ruminant fetus.

Key words: intercaruncular region, gestation, cows, buffalo cows, histiotrophic nutrition

Introdução

A placentação em ruminantes refere-se à junção do cório com o epitélio uterino, resultando na placenta funcional e nos placentônios, que são as unidades morfofuncionais (Hafez, 2001; King e Atkinson, 1987; Latshaw, 1987; Leiser et al., 1997). A placenta de ruminantes é classificada como zonária, cotiledonária e sinepiteliocorial, devido à migração de células trofoblásticas gigantes binucleadas para o epitélio uterino (Leiser e Kaufman, 1994; Pereira, 2004; Carvalho et al., 2006).

A mucosa do útero de ruminantes apresenta projeções não-glandulares, denominadas carúnculas uterinas que apresentam criptas carunculares em sua superfície, que fornecem ao conjunto um aspecto de “favo-de-colméia” (sítio de interdigitação com os vilos coriônicos), formando assim a zona de contato entre a mãe e o feto (Sharma et al., 1983; Pereira, 2004). Entre as carúnculas uterinas existe uma região pregueada, denominada intercaruncular, que microscopicamente possui epitélio simples prismático e lâmina própria. Durante a gestação, esta região libera um fluido albuminoso, denominado leite uterino, que é rico em proteínas. Isto acontece no espaço entre o epitélio uterino e o cório. Quando esta secreção é absorvida pelo trofoblasto fetal, constitui-se em importante fonte de nutrição para o feto (Amoroso, 1952; Hoyes, 1972; Mossman, 1987; Kathiresan et al., 1992; Zeller e Kuhn, 1994; Gray et al., 2001; Dantzer, 2002).

Visando a importância das características uterinas e a placentação em ruminantes, este trabalho teve como objetivo caracterizar as regiões intercarunculares da placenta de búfalos e bovinos, mediante métodos macroscópicos e de microscopia de luz, e reações histoquímicas ao longo de toda a prenhez. As informações

resultantes desta investigação poderão auxiliar no entendimento das relações materno-fetais, além da compreensão do desenvolvimento gestacional das espécies estudadas.

Material e Métodos

Para a realização desse trabalho, foram utilizadas amostras de regiões intercarunculares de úteros de 57 vacas, em diferentes fases da prenhez, provenientes de abatedouros-frigoríficos. Imediatamente após o abate, todos os animais tiveram a cavidade abdominal aberta para a retirada do útero. Para os bovinos, o material foi dividido em 4 grupos, de acordo com o tempo de gestação: 2-3, 4-6, 7-8 e 9 meses de prenhez. A seguir, foi realizada incisão craniocaudal do corno uterino gestante em direção ao cérvix. As membranas fetais foram abertas e o feto e os líquidos fetais removidos. As medidas cefalocócigeas dos fetos (CR= “Crown-Rump”) foram tomadas para determinar a idade de prenhez das vacas, conforme preconizado por Richardson (2001), na seguinte fórmula: $X = 2,5(Y + 21)$. Já para as búfalas, como sua prenhez é de 308 a 318 dias (10 meses) (Fonseca, 1986), o material foi dividido em 5 grupos de acordo com o tempo de gestação: 2-3, 4-6, 7, 8-9 e 10 meses de prenhez. As medidas cefalocócigeas dos fetos (CR= “Crown-Rump”) foram tomadas para determinar a idade de prenhez, conforme as fórmulas estabelecidas por Abdel-Raouf e El-Naggar (1969), onde $Y=74+(9/2)X$ (para fetos menores que 20cm) e $Y=74+(9/4)X$ (para fetos maiores que 20cm). Em ambas as fórmulas X é o comprimento ápice sacral (A-S), equivalente à distância do ponto mais alto da cabeça (frente) até a base da cauda, acompanhando a curvatura do corpo, e Y é a idade da prenhez a ser calculada inicialmente em dias.

Após a inversão do útero, as áreas de interesse foram analisadas macroscopicamente, fotodocumentadas e, a seguir, as regiões intercarunculares foram recortadas e fixadas em solução aquosa de formaldeído a 10% e paraformaldeído a 4% (Paraformaldehyde, Sigma Chemical Co., USA) em tampão fosfato (PBS), à 0,1M, pH 7.4, para microscopia de luz e histoquímica, respectivamente. Após a fixação, o material foi desidratado em série de etanóis, em concentrações crescentes (de 70 a 100%), e diafanizado em xilol, seguido de inclusão em Histosec® (Merck). Foram então obtidos os cortes, com espessura de 4 a 5 µm e rotineiramente corados por hematoxilina eosina, tricrômico de Masson, Picrossirius e reação histoquímica de PAS contracorada com hematoxilina de Harris. Para inclusão em metacrilato, as amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS. Após a fixação, o material foi lavado em PBS, desidratado em etanol (concentrações crescentes de 50 a 100%) e finalmente infiltrado na proporção de 1:1 em solução infiltradora (50ml de resina básica [glicol-metacrilato] e 0,5ml de ativador [peróxido de benzoila]/álcool 95%), durante 2 horas, e, em seguida, polimerizado em mistura de resina (15ml de solução infiltradora e 1ml de endurecedor, derivado do ácido barbitúrico-DMSO) em estufa a 37°C, por 3 dias (aproximadamente). Foram então obtidos cortes com espessura de 2 a 3 µm, corados por azul de Toluidina, azul de metileno e fucsina básica, e hematoxilina floxina.

Resultados

Região intercaruncular de vacas

A região intercaruncular, estava presente tanto no corno uterino gestante quanto no não-gestante (Figura 1a, b, c). São áreas de relacionamento materno e fetal, que, com o progredir da gestação, mostraram-se visualmente maiores no corno uterino gestante, quando comparadas com aquelas situadas no corno não gestante (Figura 1a, b, c).

Pode ocorrer a fusão de carúnculas vizinhas (Figura 1c), com o progredir da gestação, para a formação de carúnculas maiores. O resultado da conexão destas carúnculas fusionadas com os vilos coriônicos foi a formação de placentônios maiores.

Estruturalmente as áreas intercarunculares, compostas pelo endométrio, mostravam-se caracterizadas por epitélio simples cúbico baixo a prismático alto. A lâmina própria era composta por tecido conjuntivo frouxo. No miométrio, evidenciavam-se as camadas circular interna e externa de músculo liso, já no perimétrio, havia uma camada serosa com a presença de muitos vasos sanguíneos (Figura 2a). Ainda na região intercaruncular, foi encontrado um agrupamento de células linfóides próximo às glândulas endometriais (Figura 2b).

As glândulas endometriais eram constituídas por epitélio colunar simples e estavam distribuídas no endométrio em maior quantidade (Figuras 2c, 3b, 4b, c e 5c, d), podendo penetrar no miométrio. Com o progredir da gestação, elas aumentavam visualmente de tamanho e número (Figura 3c). Na luz destas glândulas havia restos celulares e secreções mucóides PAS positivas, as quais foram confirmadas ao microscópio de luz (Figuras 2d e 5c, d).

As glândulas endometriais reagiram positivamente à reação de Perl's que marca o ferro férrico (Figura 5 a, b).

A reação da enzima fosfatase ácida, que marca a fagocitose, foi positiva na superfície do epitélio uterino e nas glândulas endometriais.

Região intercaruncular de búfalas

A região intercaruncular do útero de búfalas não apresentou muitas diferenças em relação à de bovinos. As carúnculas eram proeminentes no endométrio, mas foi observado um evidente achatamento no eixo dorso-ventral em relação àquelas de vacas. As criptas endometriais também se apresentaram com aspecto de "favo-de-colméia" (Figura 6 a, b, c).

O epitélio uterino era do tipo simples cúbico e o endométrio apresentou um considerável número de glândulas endometriais, fibroblastos e vasos. Estes aumentaram em número e tamanho com o progredir da gestação (Figura 7a, b).

A reação de PAS para secreções mucóides foi positiva, tanto no epitélio glandular, como no lume das glândulas endometriais (Figura 7b).

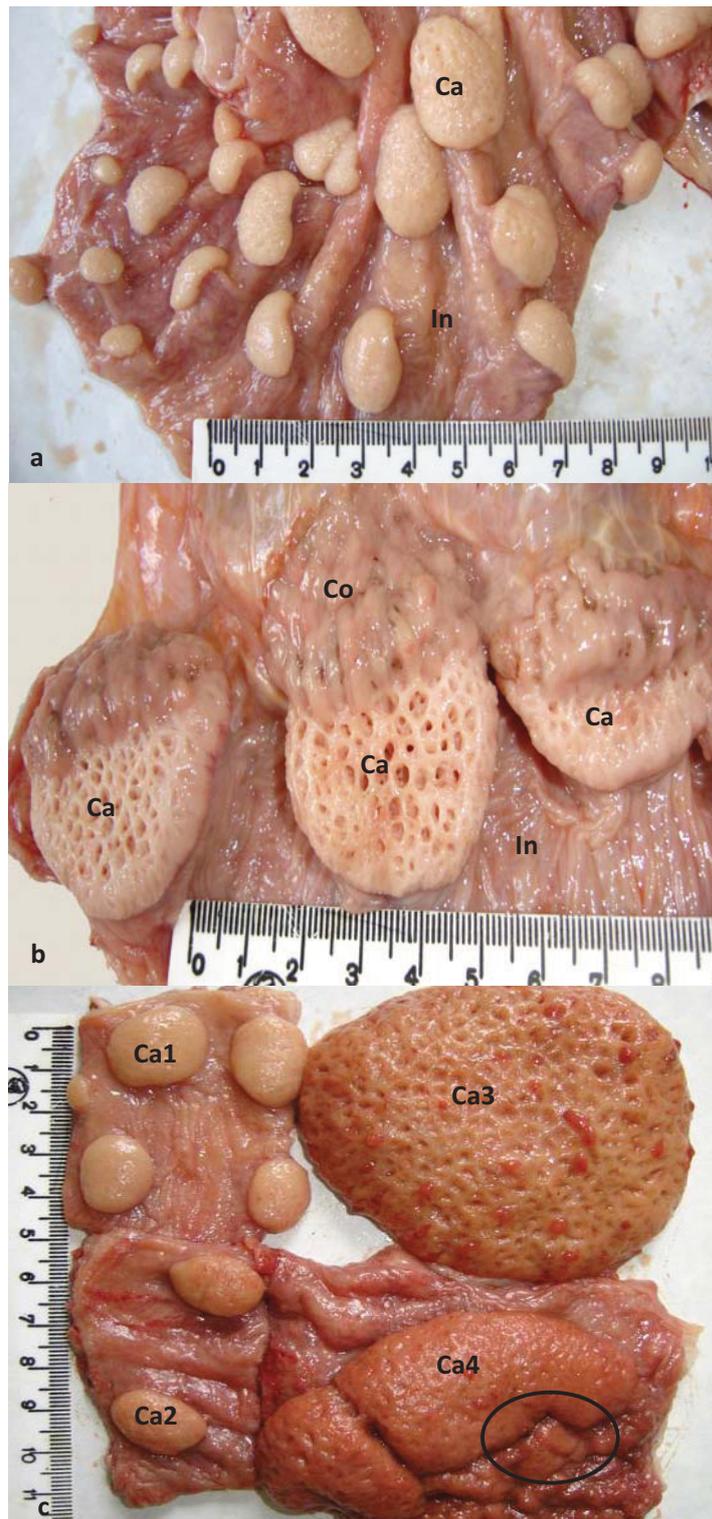


FIGURA 1: a) Carúnculas uterinas bovinas aos 3 meses de gestação (Ca) e região intercaruncular (In). b) Carúnculas uterinas bovinas aos 5 meses de gestação, demonstrando as carúnculas uterinas (Ca) desconectadas dos cotilédones (Co) e região intercaruncular (In). c) Carúnculas uterinas bovinas em diferentes estágios de prenhez: 2-3 meses (Ca1), 1-2 meses (Ca2), 7-8 meses (Ca3) e 6-7 meses (Ca4). A elipse indica uma fusão caruncular.

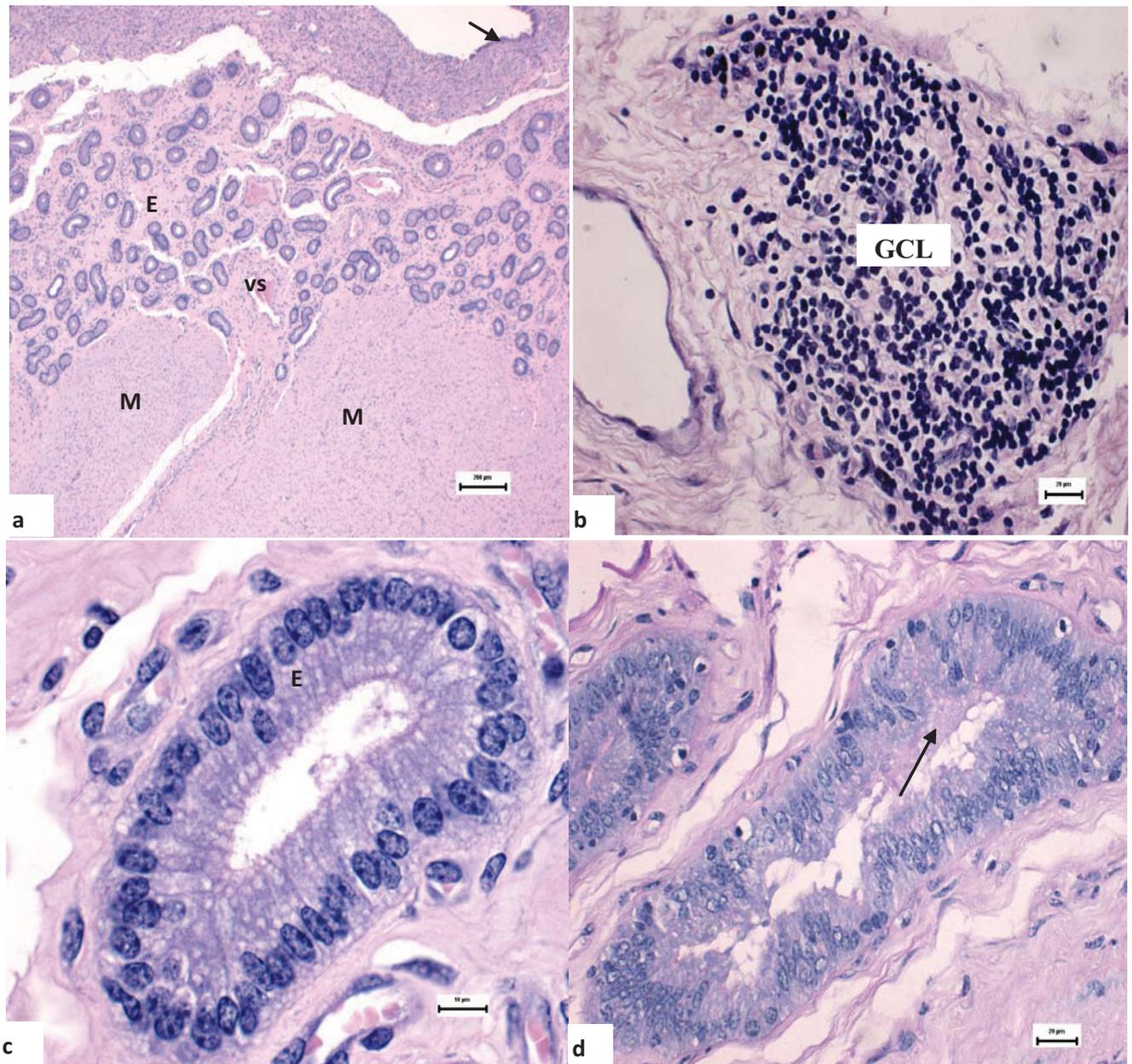


FIGURA 2: Fotomicrografias da região intercaruncular bovina. a) Notar o epitélio (seta), o endométrio (E) repleto de glândulas endometriais, o miométrio (M) e os vasos sangüíneos (vs). 2,5 meses de gestação. Hematoxilina-eosina. b) Maior aumento da figura anterior da região das glândulas endometriais (G). Vaso sangüíneo (vs). Hematoxilina-eosina. c) Demonstra em maior detalhe, uma glândula endometrial, onde se observa o epitélio prismático simples (E). Hematoxilina-eosina. d) Região da glândula endometrial, aos 6 meses de gestação, PAS positiva, onde se observa a reatividade positiva da glândula endometrial nesta fase de gestação à reação de PAS (seta).

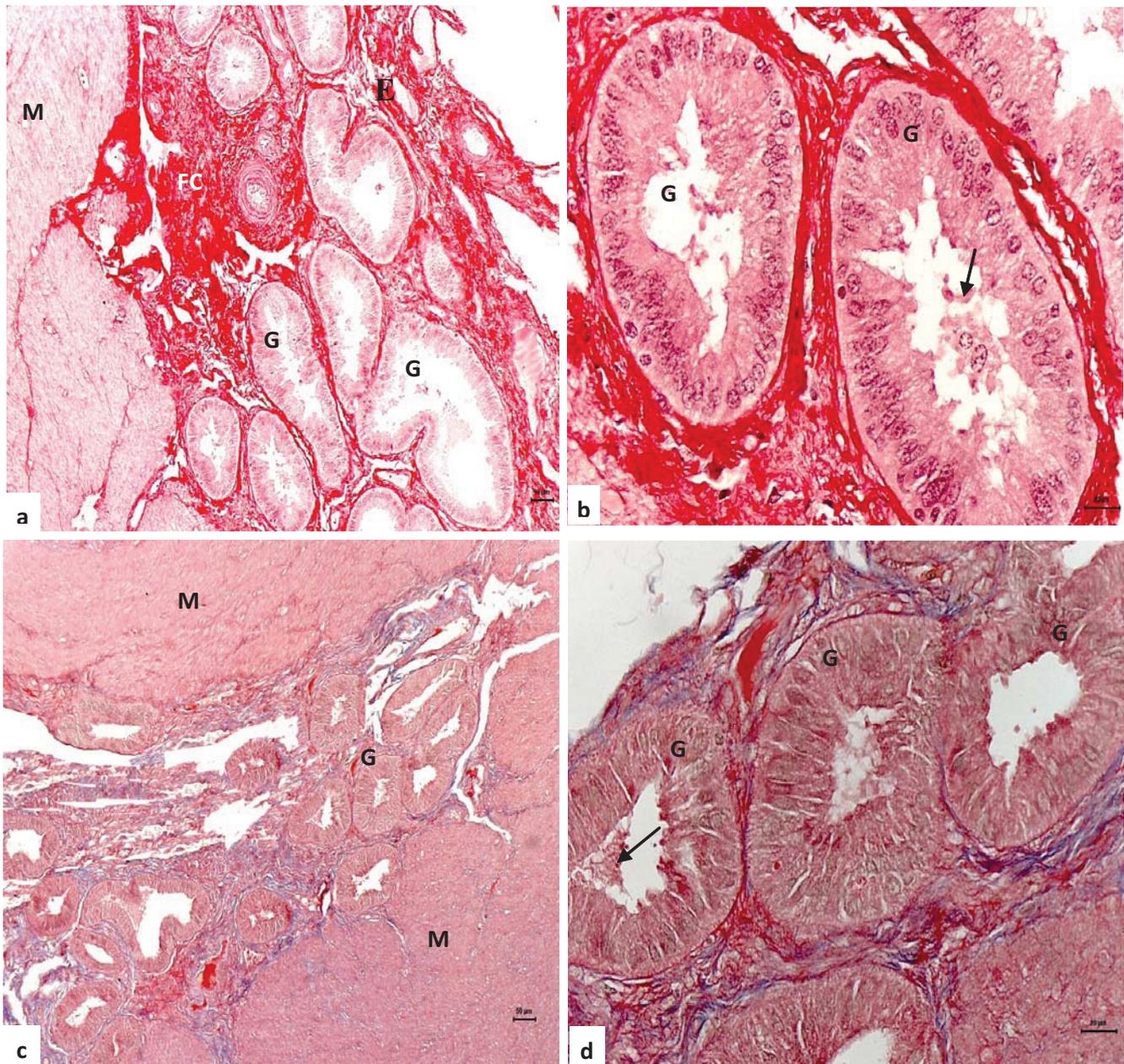


FIGURA 3: a) Endométrio (E) do útero gestante de bovinos, contendo glândulas endometriais (G), miométrio (M) e fibras colágenas (FC), aos 6 meses de gestação. Picrossírius. Barra=50 μ m. b) Ampliação da figura anterior, com observação do epitélio e das secreções glandulares (seta). Picrossírius. Barra=20 μ m. c) Glândulas endometriais (G) do útero de bovinos aos 4 meses de gestação, apresentando invasão do miométrio (M). Tricromo de Masson. Barra: 50 μ m. d) Glândulas endometriais (G) aos 6 meses de gestação, com observação de secreções histiotróficas na luz de cada glândula (seta). Tricromo de Masson. Barra=20 μ m.

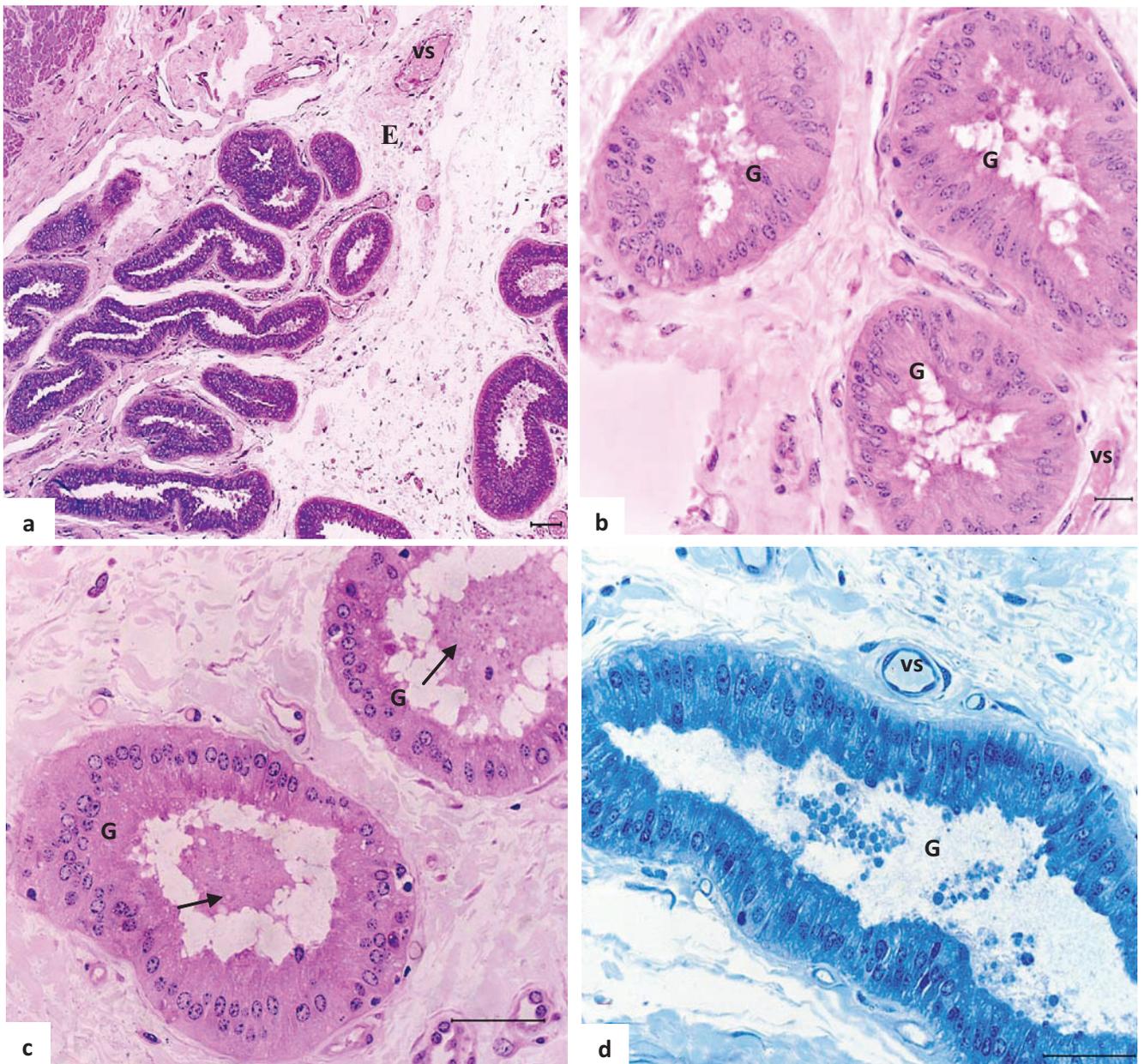


FIGURA 4: a) Região do endométrio (E) aos 6 meses de gestação com glândulas endometriais e alguns vasos sanguíneos. Histoiresina, azul de metileno e fucsina básica. Barra=50µm. b) Glândulas endometriais (G) do útero de bovinos entre 7 e 8 meses de gestação, com observação de variação do epitélio glandular de simples cúbico baixo a simples prismático alto, de acordo com a superfície da secção. Hematoxilina floxina. Barra=10µm. c) glândulas endometriais aos 9 meses de gestação, com grande quantidade de secreção (seta). Hematoxilina floxina. Barra=50µm. d) Glândula endometrial (G), aos 9 meses de gestação, com epitélio bem definido e pequenos vasos sanguíneos (vs) adjacentes. Observação de secreção histiotrófica abundante na luz da glândula. Azul de Toluidina. Barra= 10µm.

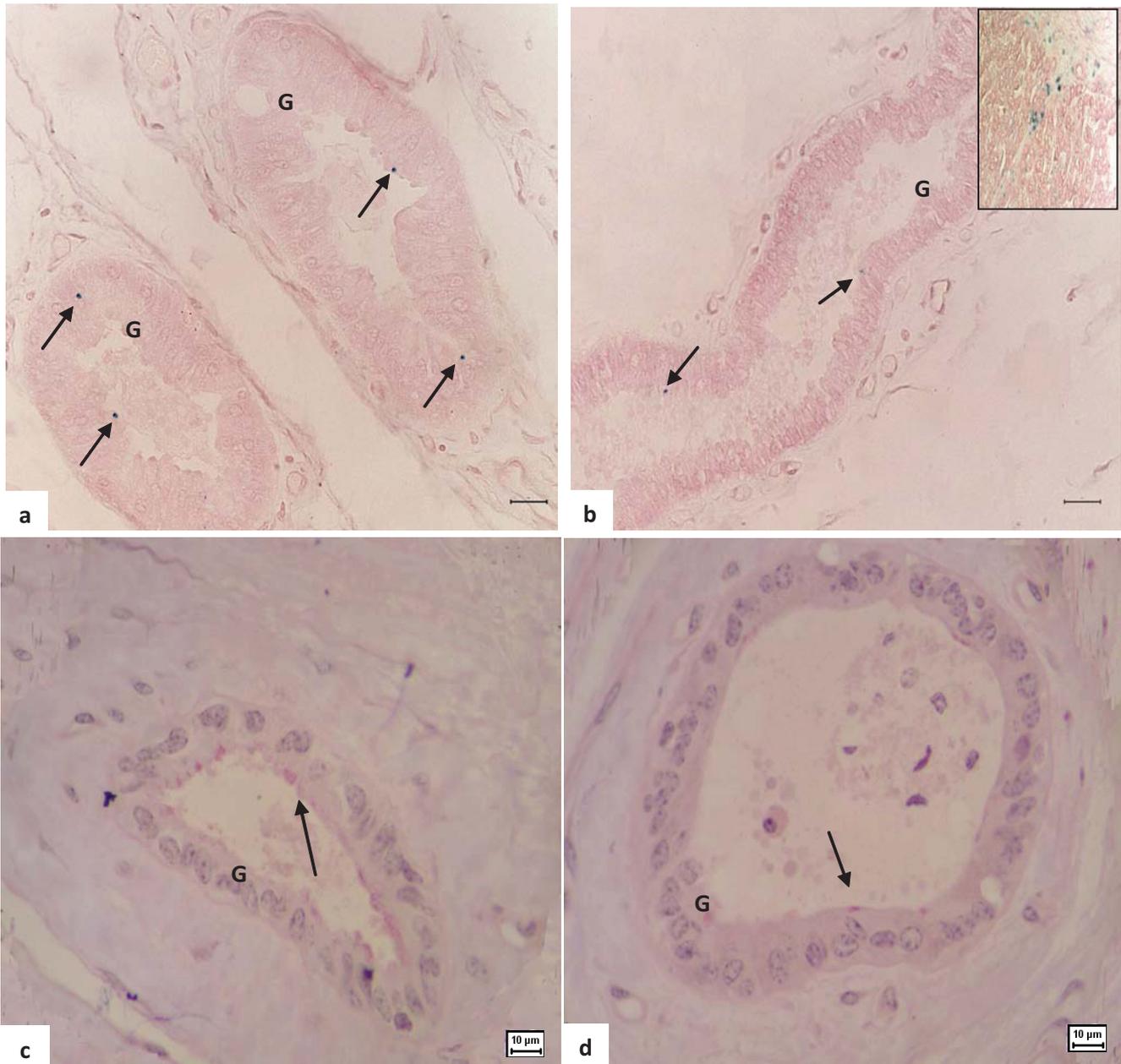


FIGURA 5: a) Glândulas endometriais (G) do útero de bovinos aos 9 meses de gestação, apresentando reatividade do ferro férrico (setas). Contracoloração de vermelho neutro. Barra=20µm. b) Mesmos resultados vistos em a, em glândula endometrial de maior calibre. Contracoloração de vermelho neutro. Barra=20µm. Figura menor: controle positivo de fígado de camundongo. Contracoloração de vermelho neutro. c) Glândulas endometriais (G) do útero de bovinos entre 5 e 6 meses de gestação apresentando reação PAS positiva na no epitélio glandular (seta) e secreção mucóide no lume. PAS. Barra=10µm. d) Acompanha os mesmos resultados apresentados em c aos 7 meses de gestação. PAS. Barra=10µm.

O epitélio das glândulas endometriais de búfalas, distribuídas pelo endométrio, foi simples prismático (Figura 7b). A reação histoquímica de Perl's foi positiva

nas glândulas endometriais (Figura 7c) de búfalas. Além disso, as glândulas uterinas demonstraram reatividade positiva também à fosfatase ácida (Figura 7d).

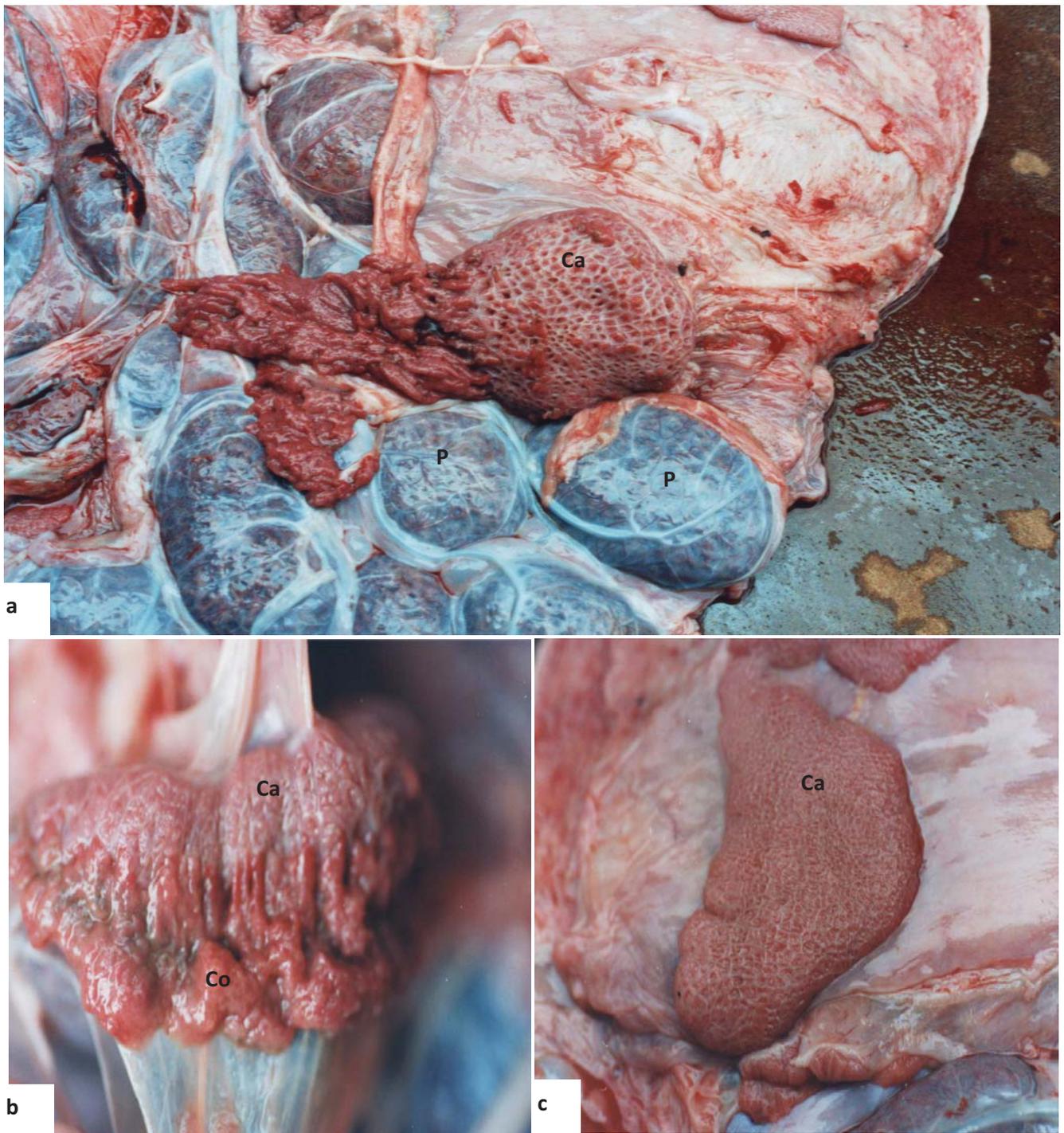


FIGURA 6: a) Placenta de búfala aos 10 meses de gestação demonstrando os placentônios (P) e em detalhe a carúncula uterina (Ca) apresentando criptas endometriais. b) Placenta de búfala aos 9 meses de gestação, demonstrando a desconexão entre a carúncula (Ca) e o cotilédone (Co). c) Detalhe do aspecto de "favo-de-colméia das carúnculas uterinas (Ca) onde se observam as criptas endometriais aos 10 meses de gestação.

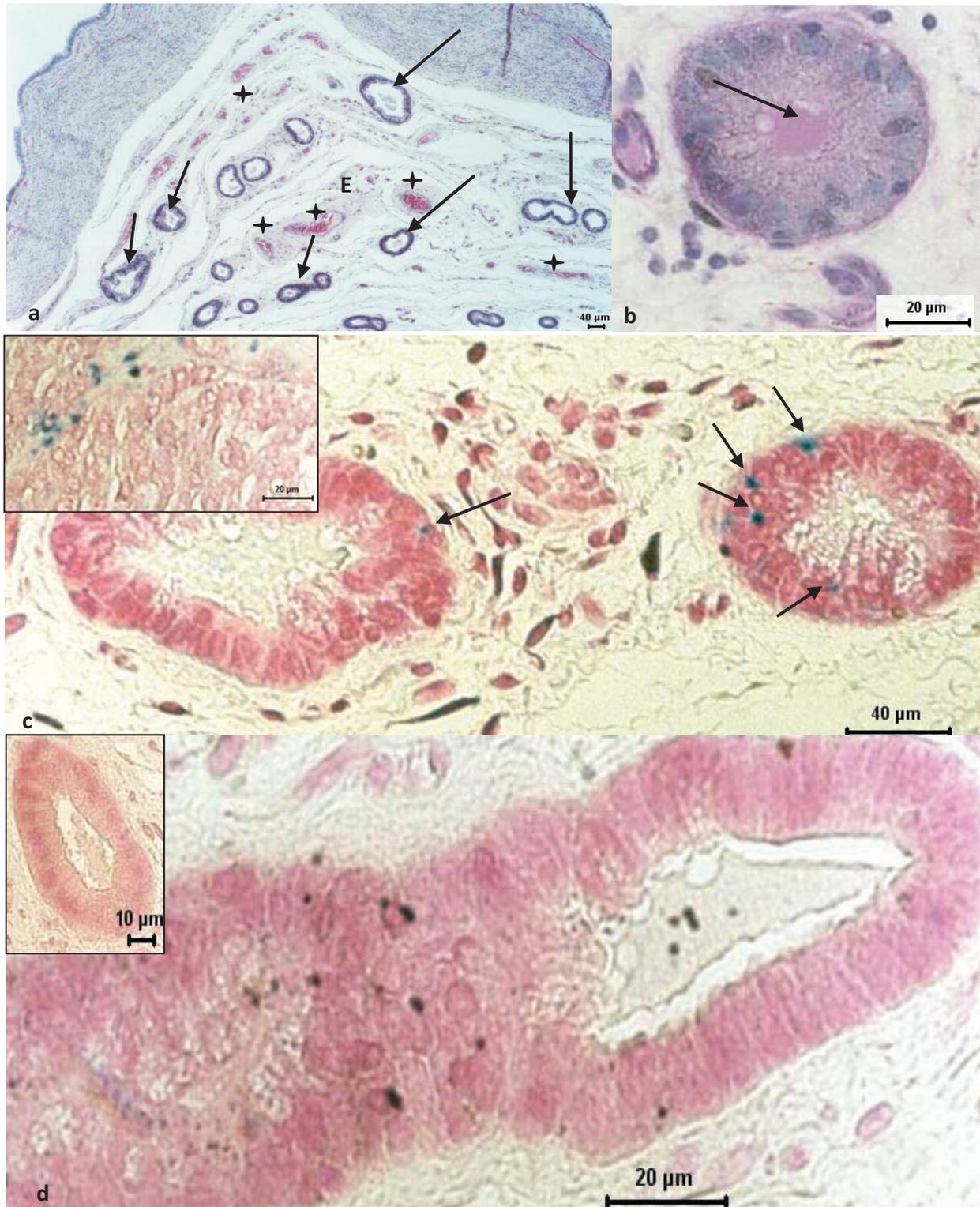


FIGURA 7: a) Região intercaruncular da placenta de búfalas aos 4-6 meses de prenhez, Endométrio (E), glândulas uterinas (setas), vasos sangüíneos (estrela). b) Secreção PAS positiva (seta) na glândula endometrial aos 4-6 meses de prenhez. c) Glândulas endometriais do útero de búfalo aos 4-6 meses de gestação, mostrando a reação de Perl's, onde a coloração azul mostra a reatividade do ferro férrico. Contracoloração pelo vermelho neutro. A foto menor é o controle positivo de fígado de camundongo. Barra=20 m. d) Fotomicrografia da glândula endometrial com 8 meses de gestação, onde se observa a reatividade da fosfatase ácida. Contracoloração pelo vermelho neutro. A figura menor inserida é o controle negativo. Barra=10 m. a) Barra=40 m; b) Barra=20 m; c) Barra=40 m e d) Barra=20 m.

Discussão

Este é um dos poucos, senão o primeiro relato comparativo entre a região intercaruncular de vacas e búfalas gestantes, animais que possuem uma placentação não-invasiva, sendo, então, a nutrição histiotrófica muito importante durante a gestação.

A região intercaruncular de bovinos e búfalos, situada entre as carúnculas uterinas, tanto no corno uterino não-gestante quanto no gestante, apresentaram-se muito desenvolvidas, aumentando de tamanho com o progredir da gestação. Fusões entre carúnculas vizinhas resultavam em carúnculas maiores, de diversos formatos. A fusão caruncular já caracterizada por Hafez (2001), Abdel-Raouf e Badawi (1966), Ram e Chandra (1984), Latshaw (1987), Neves (1996) e Feitosa-Júnior (1997) pôde ser observada em vacas, búfalas, cabras e ovinos.

O epitélio uterino variou nas duas espécies, de simples cúbico baixo a simples colunar alto. A lâmina própria era composta por tecido conjuntivo denso, enquanto que o miométrio caracterizava-se pelas camadas circular interna e externa de músculo liso. O perimétrio, por sua vez, era composto por uma camada serosa com a presença de muitos vasos sanguíneos. Entretanto, diferencia-se dos observados por Kathiresan et al. (1992) e Mossman (1987), os quais relataram que as áreas intercarunculares de vacas são compostas por endométrio constituído de epitélio colunar entremeadado a células arredondadas.

As glândulas uterinas, distribuídas pelo endométrio de bovinos e búfalos, eram constituídas por epitélio simples prismático, podendo penetrar no miométrio. Com o progredir da gestação elas aumentam visualmente, de tamanho e número, sendo importantes áreas de transferência de substâncias da mãe para o feto, incluindo o ferro, em várias espécies animais (Amoroso, 1952; Hoyes, 1972; Zeller e Kuhn, 1994; Gray et al., 2001).

A reação da enzima fosfatase ácida foi positiva na superfície do epitélio uterino e nas glândulas endometriais de vacas e búfalas, demonstrando a possível ação fagocítica dessas estruturas, confirmadas pelos trabalhos de Leiser e Wille (1975) e Pereira (2004), os quais relatam que nas glândulas endometriais há indicações de autofagia.

A reação de PAS foi positiva tanto no epitélio glandular, como no lume das glândulas endometriais de bovinos e búfalos, resultados que coincidem com os de Pereira (2004).

Em conclusão, a região intercaruncular de vacas e búfalas não apresentou diferenças morfológicas significativas. Ela parece ser uma importante via da nutrição histiotrófica, por meio das secreções encontradas nas glândulas endometriais.

Agradecimentos

Às Agências Financiadoras: Programa Institucional CNPq/PIBIC/Unesp e Fapesp, à Faculdade de Zootecnia do Campus Experimental de Dracena – Unesp, Dracena, SP e ao Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP, São Paulo, SP.

Referências

- Abdel-Raouf, M.; Badwi, H. M. 1996. Morphological study of the uterine in egyptian buffalo cows. *Zentralblatt Veterinärmedizin*, **13**: 252-263.
- Abdel-Raouf, M.; El-Naggar, M. A. 1969. The biometry of the gravid uterus in egyptian buffalo cows. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, **16** (9): 838-854.
- Amoroso, E. G. 1952. Placentation. In: Lamming, G. E. (ed.). *Marshall's physiology of reproduction*. v. 2. 3. ed. Chapman & Hall, London, UK, p.12-311.
- Carvalho, A. F.; Klisch, K.; Miglino, M. A.; Pereira, F. T.; Bevilacqua, E. 2006. Binucleate trophoblast giant cells in the water buffalo (*Bubalus bubalis*) placenta. *Journal of Morphology*, **267** (1): 50-56.
- Dantzer, V. 2002. Endometrium of epitheliochorial and endotheliochorial placentae. In: Glasser, S. R.; Aplin, J. D.; Giudice, L. C. & Tabibzadeh, S. (eds). *The endometrium*. Taylor & Francis, London, UK, p.352-368.
- Feitosa-Júnior, F.S. 1997. *Pesquisa anatômica sobre a ramificação e distribuição das artérias e veias da placenta em búfalas*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil, 237pp.
- Fonseca, W. 1986. *Búfalo: sinônimo de carne, leite, manteiga e trabalho*. 4. ed. Ícone, São Paulo, Brasil, 84pp.
- Gray, C. A.; Taylor, K. M.; Ramsey, W. S.; Hill, J. R.; Bazer, F. W.; Bartol, F. F.; Spencer, T. E. 2001. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biology of Reproduction*, **64**: 1608-1613.
- Hafez, E. S. E. 2001. Reprodução animal. Manole, São Paulo, 582pp.
- Hoyes, A. D. 1972. The endometrial glands of the pregnant sheep: an ultrastructural study. *Journal of Anatomy*, **111** (1): 55-67.

- Kathiresan, R.; Rajasundaram, R. C.; Pattabiramam, S. R. 1992. Histological and histochemical changes in the endometrium and placenta during different stages of gestation in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Indian Veterinary Journal**, **55**: 326-328.
- King, G. J.; Atkinson, B. A. 1987. The bovine intercaruncular placenta throughout gestation. *Animal Reproduction Science*, **12**: 241-254.
- Latshaw, W. K. 1987. **Veterinary developmental anatomy**. A clinically oriented approach. B.C. Decker, Toronto, Canadá, 283pp.
- Leiser, R.; Kaufman, P. 1994. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology**, **102** (3): 122-134.
- Leiser, R.; Krebs, C.; Klisch, K.; Ebert, B.; Dantzer, V.; Schuler, G.; Hoffmann, B. 1997. Fetal vilosity and microvasculature of the bovine placentome in the second half of gestation. **Journal of Anatomy**, **191**: 517-527.
- Leiser, R.; Wille, K. H. 1975. Cytochemical establishment of acid phosphatase in the bovine endometrium and trophoblast during implantation. **Anatomy and Embryology**, **148** (2): 159-173.
- Mossman, H. W. 1987. **Vertebrate fetal membranes**. Rutgers University Press, New Brunswick, Canadá, 383pp.
- Neves, W.C. 1996. **Pesquisa anatômica sobre ramificação e distribuição das artérias e veias da placenta em caprinos**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 203pp.
- Pereira, F. T. V. 2004. **Eritrofagocitose placentária em búfalas (*Bubalus bubalis bubalis*-Simpson, 1945)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil, 102pp.
- Ram, R.; Chandra, G. 1984. Macroscopic studies of the placenta of buffalo (*Bubalus bubalis*). **Indian Veterinary Journal**, **61**: 458-462.
- Richardson, C. 2001. **Veterinary reproduction and obstetrics**. Baillière Tindall, London, UK, 868pp.
- Sharma, R. D.; Nanda, B. S.; Saigal, R. P.; Khatra, G. S.; Gupta, S. K. 1983. Histomorphological and histochemical studies of placentome and expelled foetal membranes of buffalo. **Indian Journal Animal Science**, **53** (9): 964-967.
- Zeller, U.; Kuhn, H-J. 1994. Postpartum erythrophagocytosis, iron storage and iron secretion in the endometrium of the tree shrew (*Tupaia*) during pregnancy. **Journal of Anatomy**, **184**: 597-606.